

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



KLÁRA KOTLABOVÁ

Mechanismy signalizace zprostředkované
MHC glykoproteiny II. třídy v B lymfocytech

Mechanisms of MHCII signaling in B lymphocytes

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

ŠKOLITEL: MGR. TOMÁŠ BRDIČKA, PHD.

PRAHA 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 03.05.2011

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Tomáši Brdičkovi, PhD. za jeho vedení při psaní této práce, za jeho ochotu, čas a mnoho cenných rad.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Seznam zkratek	6
1. Úvod	8
2. Antigen prezentující buňky	8
3. Imunologická synapse	10
3.1. T lymfocytární strana IS	11
3.2. APC strana IS	11
4. Signalizace zprostředkovaná MHC glykoproteiny II. třídy.....	12
4.1. Struktura MHCgpII	13
4.2. Iniciační signalizace zprostředkované MHCgpII	14
4.3. Role dimeru Igα/β v signalizaci BCR	15
4.4. Role PLCγ v signalizaci zprostředkované MHCgpII	16
4.5. Vápníková odpověď a její důsledky	16
4.6. Aktivace PKC	17
4.7. MAP kinázová dráha	18
4.8. Buněčná smrt po stimulaci MHCgpII	18
4.9. MPYS	19
4.10. CD19/PI3K dráha	21
4.11. Regulace signalizace MHCgpII molekulou CD22	21
5. MHCgpII a membránové mikrodomény	21
6. Závěr	23
Použitá literatura	25

Abstrakt

Během zahájení imunitní reakce na antigen jsou peptidové fragmenty pocházející z antigenu vystavovány v komplexu s MHC glykoproteiny II. třídy (MHCgpII) na povrchu antigen prezentující buňky (APC). V průběhu rozpoznání prezentovaného antigenu T lymfocyttem vzniká v místě kontaktu s APC molekulární struktura zvaná imunologická synapse (IS). Během této interakce dochází k signalizaci z receptorů jak na T lymfocytární, tak na APC straně IS. Dlouho se myslelo, že jedinou funkcí MHCgpII je prezentace antigenu. Později však bylo zjištěno, že stimulace MHCgpII vede i ke spuštění signálů, podílejících se na rozhodnutí o dalším osudu APC. MHCgpII nemají ve své cytoplasmatické doméně signalizační motivy, a pro transdukcii signálů jsou tedy potřeba asociované molekuly. V případě B lymfocytů, na které je tato práce zaměřena, jsou to transmembránové proteiny $I\alpha/\beta$, MPYS, CD19 a CD20. Tyto molekuly po stimulaci MHCgpII zprostředkovávají signalizační události zahrnující aktivaci několika rodin protein kináz, fosfolipázy $C\gamma$, mobilizaci vápníku a aktivaci transkripčních faktorů NFAT a AP-1. Tyto signály mění další osud buňky a jejich důsledkem může být proliferace a diferenciacce, nebo také buněčná smrt.

Klíčová slova: MHCgpII, buněčná signalizace, prezentace antigenu, B lymfocyty, imunologická synapse

Abstract

During the initiation of an antigen-specific immune response, peptide fragments originating from the antigen are presented in complex with MHC class II glycoproteins (MHCgpII) on the surface of the antigen presenting cells (APC). Antigen recognition by T lymphocyte is accompanied by the formation of the molecular structure at the interface with APC called immunological synapse (IS). During this contact, signal transduction is initiated at both, T lymphocyte and APC, sides of the IS. For a long time it was thought that the only function of MHCgpII is presentation of antigen. However, later it was found that stimulation of MHCgpII led to triggering of signals contributing to decision about the further fate of APC. MHCgpII do not have any signaling motifs in their cytoplasmatic domains, and so associated molecules are necessary for the transduction of the signals. This work focuses on B lymphocytes in which the associated molecules are Ig α/β , MPYS, CD19 and CD20. After the stimulation of MHCgpII these proteins mediate signaling events including activation of several families of protein kinases, phospholipase C γ , mobilization of calcium and activation of transcriptional factors NFAT and AP-1. In B lymphocytes, activities of these pathways may result in proliferation and differentiation but also in the induction of cell death.

Key words: MHCgpII, cell signaling, antigen presentation, B lymphocytes, immunological synapse

Seznam zkratek

ADP	adenosin-5'-difosfát
AKT	„Akt transforming“, serin/threonin kináza
AMP	adenosin monofosfát
AP-1	„activator protein-1“
APC	antigen prezentující buňka
Bcl-2	„B-cell lymphoma 2“, regulátor apoptózy
BCR	„B cell receptor“, antigenně specifický receptor na B lymfocytech
BTk	„Bruton's tyrosine kinase“
cAMP	cyklický adenosin-5'-monofosfát
CD	„cluster of differentiation“
c-Fos	transkripční faktor
cSMAC	„central supramolecular activation cluster“
CTLA-4	„cytotoxic T lymphocyte antigen-4“
DAG	diacylglycerol
DC	dendritická buňka
ER	endoplasmatické retikulum
ERK	„extracellular signal-regulated kinase“
Fas	receptor, jehož stimulace vede k apoptóze buňky
Fgr	„feline Gardner-Rasheed sarcoma“
Fyn	„Frg/Yes-related novel protein tyrosine kinase“
G protein	GTP-vazebný protein
GMP	guanosin monofosfát
GPI	glykosylfosfatidylinositol
GRB2	„growth factor receptor binding protein 2“
GTP	guanosin-5'-trifosfát
HLA	„human leukocyte antigen“
HLA-DM	protein sloužící k výměně invariantního řetězce na MHC II za peptid pocházející z antigenu
HPK1	„hematopoietic protein kinase 1“
ICAM1	„intercellular adhesion molecule 1“
ICAM3	„intercellular adhesion molecule 3“
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
Ig α/β	imunoglobulin α/β , =CD79a/CD79b
Ig κ	imunoglobulin κ
Ii	invariantní řetězec
IL-2	interleukin 2
IL-4	interleukin 4
IL-5	interleukin 5
INF	interferon
IP ₃	inositol-1,4,5-trisfosfát
IS	imunologická synapse
ITAM	„immunoreceptor tyrosine-based activation motive“
ITIM	„immunoreceptor tyrosine-based inhibition motive“

JNK	„c-Jun N-terminal kinase“
LAG-3	„lymphocyte-activating gene 3“, přirozený ligand MHC II
LAT	„linker for activation of T cells“, adaptorový protein
Lck	„leukocyte-specific protein tyrosine kinase“
LFA1	„lymphocyte function-associated antigen 1“, adhezivní molekula
Lyn	„Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase“
MAPK	„mitogene-activated protein kinase“
MEK	kináza MAP kinázy
MHC	"major histocompatibility complex"
MHCgpl	MHC glykoproteiny I.třídy
MHCgpII	MHC glykoproteiny II.třídy
MIIC	„MHC II rich compartment“
MPYS	transmembránový protein, zprostředkovávající MHC II signalizaci, „methionine-proline-tyrosine-serine“
Nck	„non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein“
NFAT	„nuclear factor of activated T cells“
NFκB	„nuclear factor κB“
NK	„natural killer“
Notch	receptor na APC straně imunologické synapse
p38	protein z rodiny MAP kináz
PD-1	„programmed-death 1 receptor“
PI3K	fosfatidylinositol3-kináza
PKC	protein kináza C
PLC-γ	fosfolipáza C-γ
pMHC II	komplex MHC II s peptidem, pocházejícím z antigenu
pSMAC	„peripheral supramolecular activation cluster“
PTK	„protein tyrosine kinase“
Raf	serin/threoninová kináza, účastníci se MAPK signální dráhy
Ras	„rat sarcoma“, podrodina malých G proteinů
RasGRP3	„Ras guanine nucleotide releasing protein 3“
SHIP	„SH2-domain-containing inositol 5-phosphatase“
SHP-1	„SH2-containing tyrosine phosphatase-1“
SLP-65	„Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 65 kDa“
SLP76	„Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa“
SMAC	„supramolecular activation cluster“
SOS	„son of sevenless“, GTPázový výměnný faktor
Src	rodina proonkogenních tyrosinových kináz, „sarcoma“
STING	= MPYS, „stimulator of interferon genes“
Syk	„spleen tyrosine kinase“
TCR	"T cell receptor", antigenně specifické receptor na T lymfocytech
Tec	„tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma“
TSST-1	„toxic shock syndrome toxin 1“
Vav	výměnný faktor malých G proteinů
WASP	„Wiscott-Aldrich syndrome protein“
ZAP-70	„zeta-associated phosphoprotein of 70 kDa“
αCP	„α connecting peptide“

1. Úvod

Pro aktivaci mechanismů antigenně specifické imunitní odpovědi je nezbytné rozpoznání antigenu efektorovými buňkami této reakce, tedy B a T lymfocyty. Rozpoznání cizorodého antigenu T lymfocyty je, na rozdíl od B lymfocytů, podmíněno jeho vazbou na MHC (major histocompatibility complex) glykoproteiny II. třídy (MHCgpII) nacházející se na povrchu antigen prezentujících buněk (APC), mezi které patří dendritické buňky, makrofágy a B lymfocyty. T buňky rozpoznávají tento komplex, tvořený peptidem pocházejícím z antigenu a molekulou MHCgpII, pomocí svého antigenně specifického T receptoru (TCR). Kromě vazby TCR na komplex peptid-MHCgpII během této reakce vzájemně interaguje řada kostimulačních a adhezivních molekul na povrchu T lymfocytu a APC, a v místě jejich kontaktu tak vzniká molekulární struktura zvaná imunologická synapse (IS) (Fooksman et al., 2010). T lymfocytární strana IS je podrobně prostudovaná a je již dlouho známo, že stimulace TCR a dalších molekul spouští signalizaci vedoucí k aktivaci T buněk, které jsou tak schopny vykonávat své efektorové funkce. APC-straně IS však tolik pozornosti věnováno nebylo a relativně do nedávna se myslelo, že jedinou funkcí MHCgpII je prezentace antigenu. Molekula MHCgpII je však vazbou s TCR také stimulována a spouští signalizační dráhy se zajímavými důsledky, jako je proliferace a diferenciacce nebo také apoptóza APC. Signalizace zprostředkovaná MHCgpII se tedy může podílet na zahájení nebo ukončení imunitní odpovědi na antigen (Al-Daccak et al., 2004).

Přestože má signalizace přes MHCgpII nezanedbatelný význam pro osud APC po setkání s T lymfocytem, je toto téma v odborné literatuře zanedbáváno a například signalizace přes MHCgpII v B lymfocytech nebyla už řadu let shrnuta ve specializovaném přehledném článku. Cílem této práce je tedy stručně popsat problemiku IS, vznikající mezi T lymfocytem a APC, a hlavně sepsat poznatky o signalizaci zprostředkované molekulami MHCgpII v B lymfocytech a navrhnout model, jak by se jednotlivé signální dráhy mohly podílet na jejich výsledných efektech.

2. Antigen prezentující buňky

Antigen prezentující buňky hrají důležitou roli v antigenně specifické imunitě. Jsou schopné antigen pohltnout, zpracovat a prezentovat ho T lymfocytům, které jsou tímto antigenem aktivovány a mohou pak vykonávat své efektorové funkce. Antigen je na povrchu APC vystavován v komplexu s MHC glykoproteiny I. a II. třídy, protože jen tak může být rozeznán antigenně specifickým T receptorem. Zdrojem peptidů vázaných na MHCgpI jsou endogenní,

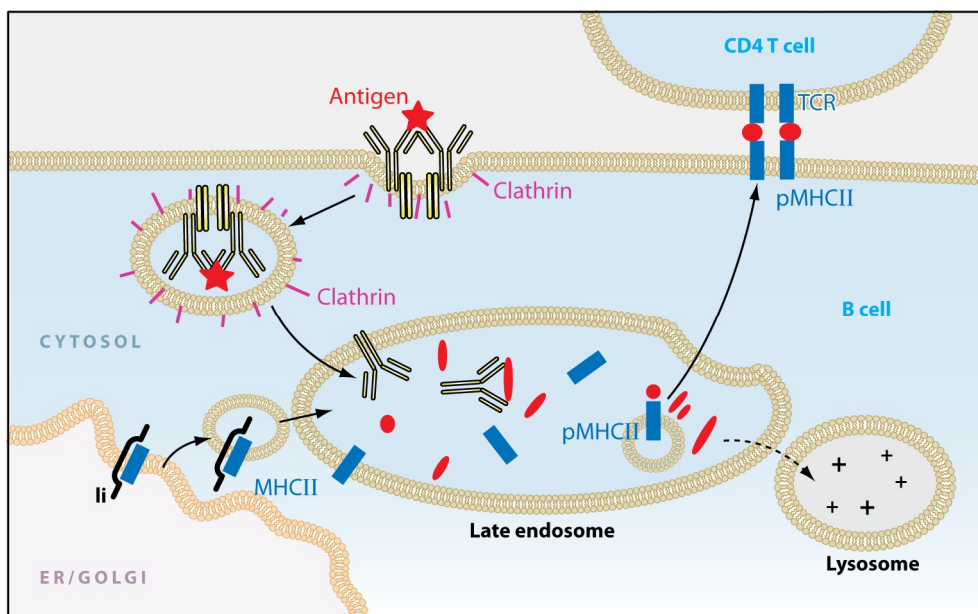
buněčné a virové, proteiny, syntetizované antigen prezentující buňkou, které jsou ubikvitinylovány a následně štěpeny v proteasomu. MHCgpI však mohou prezentovat i peptidy exogenního původu za pomoci procesu, který se nazývá cross-prezentace (Trombetta et al., 2005). Exogenní antigeny jsou běžně prezentovány na molekulách MHCgpII. Antigeny jsou endocytovány a na MHCgpII se váží ve specializovaných pozdních endozómech, zvaných také MIIC kompartmenty (MHCgpII-rich compartments). Komplex peptid-MHCgpII je následně transportován na povrch buňky, kde je antigen prezentován $CD4^+$ T lymfocytu. Na MHCgpII se také mohou dostat organismu vlastní peptidy, pocházející např. z rezidentních endozomálních proteinů, fagocytovaných apoptotických tělísek nebo autofagozómů (Trombetta et al., 2005).

MHCgpII jsou spolu s kostimulačními molekulami, potřebnými pro aktivaci T lymfocytů, konstitutivně exprimovány profesionálními APC, mezi které patří dendritické buňky (DC), makrofágy a B lymfocyty. Neprofesionální APC, jako jsou buňky epiteliální, endoteliální, nádorové a T lymfocyty, mohou MHCgpII exprimovat inducibilně a produkují variabilní množství kostimulačních molekul, což se projevuje variabilní schopností účinně prezentovat antigen (Holling et al., 2004; Trombetta et al., 2005).

Dendritické buňky jsou nejvýznamnějšími APC a prezentace antigenu se zdá být, na rozdíl od makrofágů a B lymfocytů, jejich primární funkcí. Dendritické buňky v periferních tkáních pohlcují antigeny a štěpí je na peptidové fragmenty, které se váží na MHCgpI a II. DC poté migrují do sekundárních lymfoidních orgánů, kde antigeny prezentují $CD8^+$ a $CD4^+$ T lymfocytům, a iniciují tak antigenně specifickou imunitní odpověď nebo imunologickou toleranci. (Trombetta et al., 2005).

Makrofágy hrají důležitou roli v nespecifické imunitě tím, že fagocytují mikroorganismy. Pohlcené antigeny pak mohou prezentovat T lymfocytům. Stimulace T lymfocytů je však ve srovnání s dendritickými buňkami méně účinná (Trombetta et al., 2005).

Přestože nejdůležitější funkcí B lymfocytů je produkce protilátek, hrají důležitou roli i v prezentaci antigenů. Pohlcení antigenu B buňkami probíhá převážně mechanismem receptorem zprostředkované endocytózy (Obr. 1). Rozpoznání antigenu antigenně specifickými B receptory (BCR) vede k jejich rychlé internalizaci pomocí klatrinových váčků, ke zpracování antigenu, jak bylo popsáno výše, a jeho prezentaci T lymfocytu o stejné antigenní specifitě. Interakce s takovýmto T lymfocytem, která se odehrává v sekundárních lymfoidních orgánech, může vést k aktivaci obou zúčastněných buněk (Kurosaki et al., 2010; Rodriguez-Pinto et al., 2005)



Obr.1 Prezentace antigenu u B lymfocytů (Kurosaki et al., 2010)

3. Imunologická synapse

Při studiu aktivace T lymfocytů antigenními peptidy prezentovanými APC bylo popsáno shlukování molekul, účastnících se interakce mezi T buňkou a APC. TCR byly nalezeny ve středu kontaktu mezi oběma buňkami a tato oblast byla pojmenována cSMAC (central supramolecular activation cluster), adhezivní molekuly LFA1 (lymphocyte function-associated antigen 1) byly nalezeny na okraji tohoto kontaktu a tato oblast byla pojmenována pSMAC (peripheral supramolecular activation cluster) (Monks et al., 1998). V obou SMAC oblastech byly pak identifikovány další povrchové i intracelulární molekuly na T i APC straně kontaktu a pro toto specifické molekulární T-APC spojení se začalo používat označení imunologická synapse (Grakoui et al., 1999).

IS může být strukturou s různým stupněm stability a uspořádanosti, což je ovlivněno stupněm zralosti T lymfocytu, typem APC, množstvím antigenu prezentovaného na APC a komplexitou prostředí, kde se interakce odehrává. V imunologické synapsi může také docházet k cílené sekreci aktivních molekul jako jsou cytokiny nebo granzymy a perforiny. Tento druh synapse vzniká například mezi B lymfocyty a pomocnými T lymfocyty, které tak sekrecí cytokinů poskytují B lymfocytům pomoc, vedoucí k izotopovému přesmyku a diferenciaci na plasmatické buňky (Friedl et al., 2005). Signalizace z IS určuje další osud jak T lymfocytu, tak antigen prezentující buňky.

3.1. T lymfocytární strana IS

Rozpozná-li T lymfocyt prostřednictvím svého antigenně specifického receptoru (TCR) na povrchu APC specifický peptid v komplexu s MHCgpII (pMHCgpII) a naváže-li se současně LFA1 na ICAM1 (intercellular adhesion molekule 1) na povrchu APC, dojde k zastavení migrace T lymfocytu. Interakce mezi T buňkou a APC vede k polarizaci aktinového a tubulinového cytoskeletu, který podporuje přísun povrchových receptorů (TCR a kostimulačních molekul), adhezivních molekul a intracelulárních signalizačních komponent do oblasti kontaktu, a dochází tedy k uspořádání cSMAC a pSMAC imunologické synapse (Friedl et al., 2005).

Stimulace TCR a kostimulačních molekul v místě kontaktu mezi oběma buňkami pak vede k aktivaci několika rodin protein kináz, fosfolipázy C- γ a dalších signalizačních enzymů a adaptorových proteinů. Signální dráhy kontrolované těmito proteiny pak mění genovou expresi a metabolismus T lymfocytu a vedou k aktivaci efektorových funkcí nebo proliferaci a diferenciaci. Podrobný popis těchto dějů však přesahuje rámec této práce a byl zpracován v mnoha kvalitních přehledných člancích (např. Smith-Garvin et al., 2009).

3.2. APC strana IS

Ve srovnání s T lymfocyty nebylo APC straně imunologické synapse věnováno tolik pozornosti, a poznatky o její struktuře a fungování nejsou tedy tak rozsáhlé. Vzhledem k zaměření této práce zde však bude toto téma popsáno podrobněji. Předpokládá se, že uspořádání molekul na APC straně IS se podobá T lymfocytární straně, protože mnoho molekul, účastnících se IS na povrchu APC, má své ligandy na T lymfocytech. Příkladem mohou být molekuly MHCgpII na povrchu dendritických buněk, které se nacházejí v oblasti protilehlé CD3 molekulám, asociovaným s TCR (Rodriguez-Fernandez et al., 2010).

Další významnou molekulou APC strany IS je CD40, nacházející se v oblasti cSMAC a vážící CD40 ligand (CD40L, také označovaný CD154) na povrchu T buňky (Boisvert et al., 2004). Stimulace CD40 na dendritických buňkách zvyšuje expresi cytokinů a kostimulačních molekul, a tím posiluje schopnost těchto buněk aktivovat T lymfocyty. Signalizace CD40 v B lymfocytech podporuje tvorbu germinálních center, somatickou hypermutagenezi, izotypový přesmyk imunoglobulinů a následný vznik dlouhožijících paměťových a plazmatických buněk. CD40 zároveň hraje důležitou roli v přežívání a životaschopnost dendritických buněk, B lymfocytů a dalších buněčných typů (Elgueta et al., 2009)

Nezbytnými adhezivními molekulami na APC straně IS jsou ICAM1 a ICAM3, které váží LFA-1 na T lymfocytu, a vytváří tak kruh adhezivních molekul na periférii IS, nutný pro

těsný kontakt APC a T lymfocytu. Interakce ICAM3-LFA1 na DC vede navíc k laterálnímu pohybu molekul MHCgpII do oblasti mezibuněčného kontaktu (Barreiro et al., 2007).

Dalšími molekulami, nacházejícími se na APC straně IS, jsou proteiny CD70, plexin-A1 a Notch, podílející se na reorganizaci aktinového cytoskeletu a regulaci genové exprese. V cytoplasmatické části synapse se nachází shluky F-aktinu, důležitého pro udržení struktury IS, a protein WASP (Wiscott-Aldrich syndrome protein), regulující polymeraci aktinu. Do oblasti IS je orientováno i mikrotubuly organizující centrum (MTOC), zajišťující transport MHCgpII do IS, a nacházejí se zde adaptorové proteiny a další molekuly, účastníci se signalizace z receptorů (Rodriguez-Fernandez et al., 2010).

Ústřední molekulou IS antigen prezentujících buněk je MHCgpII, nacházející se v oblasti cSMAC. Jak již bylo řečeno výše, jeho hlavní funkcí je prezentace antigenů exogenního původu pomocným T lymfocytům. Vazbou TCR je z MHCgpII ale také spouštěna signalizace, jejímž výsledkem může být proliferace, diferenciaci a maturace APC, produkce cytokinů, nebo také smrt buňky. Signalizace zprostředkovaná MHCgpII se tedy podílí na zahájení i ukončení imunitní odpovědi. Cílem této práce je popsat mechanismy signalizace zprostředkované molekulami MHCgpII v B lymfocytech.

4. Signalizace zprostředkovaná MHC glykoproteiny II. třídy

Už před více než dvaceti lety bylo zjištěno, že prokřížení molekul MHCgpII na povrchu B lymfocytů může vést k jejich proliferaci a diferenciaci. Po stimulaci MHCgpII monoklonálními protilátkami, které předcházela aktivace protilátkou proti BCR a interleukinem IL-4, došlo k proliferaci těchto myších B buněk a při současné inkubaci s dalšími cytokiny i k produkci protilátek třídy IgM a IgG (Cambier et al., 1989). Stimulace MHCgpII na povrchu lidských B buněk superantigenem TSST-1 (toxic shock syndrome toxin 1) také vedla k proliferaci a diferenciaci na buňky sekretující protilátky (Fuleihan et al., 1991; Mourad et al., 1989). Zvýšená exprese IgM po aktivaci HLA-DR byla pozorována i Tabatou (Tabata et al., 2000). Dále bylo zjištěno, že stimulace MHCgpII vede k aktivaci LFA-1, a přispívá tak k adhezi mezi T a B lymfocytem (Mourad et al., 1990). Adheze může být ale také zvýšena mechanismem, který je na LFA-1 nezávislý (Kansas et al., 1991). Prokřížení MHCgpII molekul dále indukuje expresi kostimulačních molekul CD80 (Nabavi et al., 1992) a CD86 (Nashar et al., 2006), což vede k účinnější prezentaci antigenu.

Také bylo zjištěno, že signalizace vedoucí z HLA-DR může způsobovat rychlou programovanou smrt aktivovaných B lymfocytů (Truman et al., 1994). To má význam nejen

pro ukončení imunitní odpovědi vůči určitému antigenu, ale také pro možnou léčbu lymfomů odvozených od B lymfocytů. Schopnost HLA-DR signálů spouštět apoptózu byla totiž prokázána i u těchto nádorových buněk (Drenou et al., 1999). Následně byly tedy vyvinuty potenciálně terapeuticky využitelné protilátky proti HLA-DR, které vykazují vysokou specifitu pouze pro aktivované a nádorové B lymfocyty. Nyní jsou tyto protilátky klinicky testovány a je zkoumán mechanismus jejich účinku a terapeutická účinnost (Brown et al., 2001; Carlo-Stella et al., 2006; Nagy et al., 2002). Výhodou použití protilátek proti HLA-DR při léčbě lymfomů je nezávislost na stavu imunitního systému pacienta. Tak tomu není například při terapeutickém využití protilátek proti CD20 a CD52, kdy je pro ničení nádorových buněk využíván komplement a mechanismus cytotoxické reakce závislé na protilátkách (Dyer et al., 1989; Vose et al., 2001).

Kromě TCR, superantigenů a monoklonálních protilátek proti MHCgpII může být MHCgpII receptor stimulován i molekulou LAG-3 (lymphocyte-activating gene 3), označovanou také jako CD223. LAG-3 je protein příbuzný koreceptoru CD4 a je exprimován na povrchu NK buněk a aktivovaných T lymfocytů, kde je asociován s komplexem TCR/CD3 (Triebel et al., 2003). Účinky stimulace MHCgpII ligandem LAG-3 byly studovány zejména u dendritických buněk. Transdukce signálu z MHCgpII zde vedla k aktivaci a maturaci DC, zahrnující například expresi chemokinů a chemokinových receptorů (Andreae et al., 2003; Andreae et al., 2002; Buisson et al., 2003).

4.1. Struktura MHCgpII

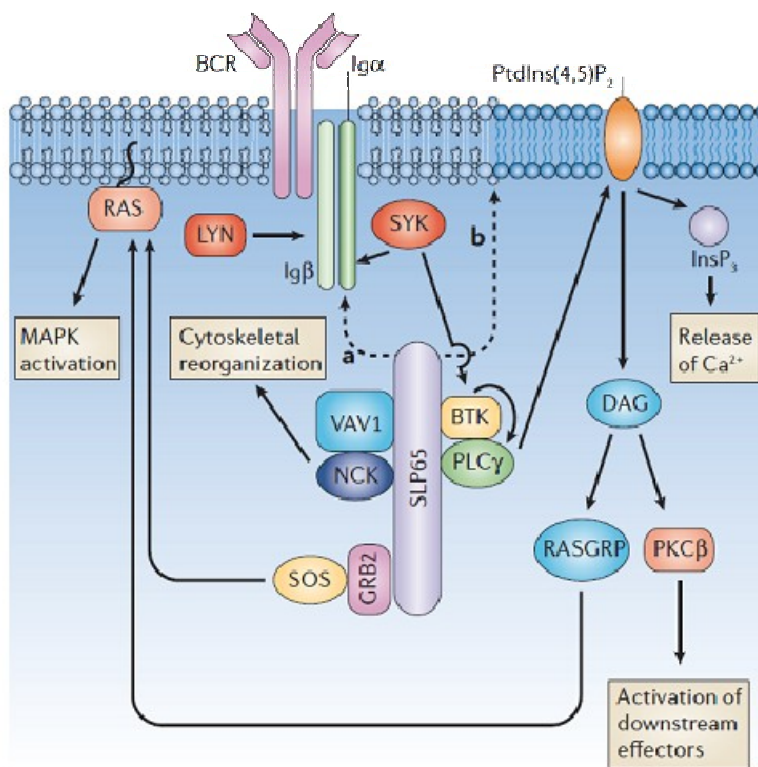
Geny kódující MHC glykoproteiny II. třídy jsou součástí hlavního histokompatibilního komplexu, který se u lidí nachází na VI. a u myší na XVII. chromosomu. Lidé mají tři izotypy klasických MHCgpII, označované jako HLA-DR, -DQ a -DP, u myší jsou pouze dva izotypy, označované I-A a I-E. MHCgpII je heterodimer, tvořený nekovalentně spojenými transmembránovými glykoproteinovými řetězci α o velikosti 35 kDa a β o velikosti 28 kDa, které patří do rodiny imunoglobulinů. Každý řetězec se skládá z N-koncové extracelulární části, tvořené dvěma globulárními doménami, z hydrofobní transmembránové domény a krátkého C-koncového cytoplasmatického řetězce. V extracelulární doméně se nachází žlábek pro vazbu peptidového fragmentu, který může mít variabilní délku. Žlábek je tvořen β -listem a dvěma paralelními α -helixy, mezi kterými peptid leží (Apostolopoulos et al., 2008). Ačkoli má MHCgpII jen velmi krátkou intracelulární část bez signalizačních motivů, stimulace MHCgpII vede k řadě signalizačních událostí.

4.2. Iniciační signalizace zprostředkovaná MHCgpII

Jak již bylo řečeno výše MHCgpII má jen velmi krátké intracelulární domény bez signalizačních motivů, a je tedy nutná přítomnost asociované molekuly, schopné přenést signál z receptoru do buňky. Jednou z asociovaných molekul, účastnících se přenosu signálu z MHCgpII, je transmembránový heterodimer $I\alpha/\beta$, označovaný také jako CD79a/CD79b (Lang et al., 2001). Hlavní funkcí $I\alpha/\beta$ dimeru v B lymfocytech je transdukce signalizace vycházející z BCR a interakce BCR- $I\alpha/\beta$ je zde zprostředkována transmembránovou doménou receptoru (Campbell et al., 1994; Kurosaki et al., 2010). Jinak je tomu u asociace $I\alpha/\beta$ s MHCgpII, kde bylo interakční místo zamapováno do oblasti, označované jako α CP (connecting peptide), která spojuje transmembránovou a extracelulární doménu MHCgpII (Jin et al., 2008a). Ačkoli se $I\alpha/\beta$ účastní signalizace z BCR i MHCgpII, tyto receptory zřejmě nesdílí dimery $I\alpha/\beta$ a každý využívá k signalizaci vlastní populaci (Lang et al., 2001). MHCgpII pravděpodobně získává $I\alpha/\beta$ dimer od BCR cestou, která je společná s cestou zpracování antigenu. Jak už bylo popsáno v kapitole o APC, BCR je po navázání antigenu internalizován, antigen je naštěpen na peptidové fragmenty, které jsou v MIIC kompartmentu navázány na MHCgpII, a tento komplex je pak vystaven na povrchu buňky. Jelikož je dimer $I\alpha/\beta$ v době internalizace asociován s BCR, může být také endocytován a spolu s komplexem peptid-MHCgpII pak může putovat na membránu. Tuto hypotézu podporuje fakt, že stimulace B buněk antigenem vede k asociaci MHCgpII s $I\alpha/\beta$ (Lang et al., 2001) a že byly dimery $I\alpha/\beta$ po stimulaci BCR nalezeny v MIIC kompartmentech (Drake et al., 1997). Existují ale také práce, které jsou s tímto modelem v rozporu. Je zde ukazována signalizace zprostředkovaná MHCgpII (konkrétně mobilizace vápníku, která bude popsána dále) bez předchozí aktivace přes BCR, a to jak u lidských (Lane et al., 1990; Mooney et al., 1990), tak u myších B lymfocytů (Nashar et al., 2006). Tyto experimenty naznačují, že pro asociaci MHCgpII s $I\alpha/\beta$ není nutná internalizace komplexu BCR- $I\alpha/\beta$, a že tedy MHCgpII mohou dimery $I\alpha/\beta$ získávat i jinou cestou. Například by mohly být nově syntetizované $I\alpha/\beta$ molekuly dopravovány na membránu rovnou k MHCgpII klasickou sekretorickou dráhou bez předchozí asociace s BCR. Dalším možným vysvětlením je, že se na signalizaci MHCgpII mohou podílet jiné molekuly než $I\alpha/\beta$, které mohou tento dimer v některých situacích zastoupit. Odlišné výsledky experimentů mohly být také způsobeny použitím různých protilátek proti MHCgpII, které se na něj mohou různě silně vázat. Při použití silných protilátek tak mohla být z MHCgpII spuštěna signalizace i bez předchozí aktivace buněk přes BCR. Toto jsou jen možná vysvětlení této kontroverze a pro její vyřešení bude třeba další studium.

4.3. Role dimeru Igα/β v signalizaci BCR

Jelikož Igα/β zprostředkovává signály vedoucí z BCR, předpokládá se, že signalizace z MHCgpII, zprostředkovaná Igα/β dimery, by mohla být analogická. Po stimulaci BCR se spouští následující signalizační kaskáda (Obr. 2): ITAM motivy na cytoplasmatických doménách Igα a Igβ jsou fosforylovány kinázou Lyn z rodiny Src kináz. To vede ke změně konformace Igα/β a následné vazbě a aktivaci dalších signalizačních molekul, jako například Syk kináz. Syk kinázy fosforylují adaptorový protein SLP-65, který pak tvoří lešení signalizačního komplexu. Na SLP-65 se váží GTPázový výměnný faktor Vav a adaptorový protein Nck, které regulují reorganizaci cytoskeletu. Na SLP-65 se také váže adaptorový protein GRB2, který váže GTPázový výměnný faktor SOS, schopný aktivovat GTPázu Ras. Navíc je k membráně přiveden GTPázový výměnný faktor RasGRP3 (Ras guanine nukleotide releasing protein 3), který také aktivuje Ras. Dále se na fosforylovaný SLP-65 váže kináza HPK1, kináza BTK z rodiny Tec a nejdůležitější člen signalizačního komplexu, PLCγ. Kinázy Syk a BTK pak aktivují PLCγ, která štěpí membránové fosfoinositidy na volný inositol-1,4,5-trisfosfát (IP₃) a v membráně vázaný diacylglycerol (DAG). Tito druzí poslové pak spouští další signalizační dráhy (Koretzky et al., 2006; Kurosaki et al., 2010).



Obr. 2 Igα/β a SLP-65 v signalizaci z BCR (upraveno dle Koretzky et al., 2006)

4.4. Role PLC γ v signalizaci zprostředkované MHCgpII

Prokřížení molekul MHCgpII na B buňkách vede k fosforylaci Ig α a Ig β a ke zvýšení tyrozinové fosforylace proteinů, které je pravděpodobně způsobeno aktivací proteinových tyrozin kináz (PTK) (Lang et al., 2001). Po stimulaci MHCgpII byla pozorována aktivace kinázy Syk a kináz Lyn a Fgr z rodiny Src (Kanner et al., 1995; Morio et al., 1994). Po stimulaci MHCgpII bylo též zjištěno zvýšení hladiny IP $_3$ v buňce (Lane et al., 1990). Nejpravděpodobnějším vysvětlením těchto jevů je, že aktivované PTK spouští dráhy, vedoucí k fosforylaci PLC γ a následné produkci IP $_3$ a DAG, stejným mechanismem jako v případě stimulace B buněk antigenem. Avšak fosforylace PLC γ ani adaptorového proteinu SLP-65 a kinázy BTK, které se na aktivaci PLC γ podílejí, zatím po aktivaci MHCgpII popsána nebyla, a prozatím je tedy tento závěr do jisté míry spekulativní.

Kromě dimerů Ig α/β by aktivaci PLC γ mohla zprostředkovávat i molekula CD20, která s MHCgpII také interaguje (Leveille et al., 1999; Leveille et al., 2002). CD20 je transmembránový protein, exprimovaný zralými B lymfocyty, a je asociovaný se Src kinázami Lyn, Lck a Fyn. Stimulace CD20 pomocí protilátek vede k aktivaci Src kináz, fosforylaci PLC γ 1 a PLC γ 2 a mobilizaci vápníku z intracelulárních zdrojů (Deans et al., 2002). Přesný mechanismus však také není dosud znám.

4.5. Vápníková odpověď a její důsledky

Jak již bylo uvedeno výše, aktivovaná PLC γ štěpí membránové fosfoinositidy na IP $_3$ a DAG. IP $_3$ pak způsobí uvolnění vápenatých iontů z ER následované dalším přísunem z extracelulárního prostoru (Kurosaki et al., 2010). Bylo zjištěno, že pro vápníkovou odpověď, spouštěnou stimulací MHCgpII, je nezbytná aktivace PTK (Haylett et al., 2009). To podporuje model dráhy zmíněný v předchozí kapitole, kdy jsou po stimulaci MHCgpII aktivovány PTK, které fosforylují PLC γ . Ta následně produkuje IP $_3$, který způsobuje mobilizaci vápníku.

Haylett et al. také ukázali, že stimulace MHCgpII a následná mobilizace vápníku vede k aktivaci transkripčního faktoru NFAT-1 (nuclear factor of activated T cells 1). Dále zjistili, že k významnější aktivaci NFAT-1 dojde, pakliže stimulaci MHCgpII předchází aktivace přes BCR (Haylett et al., 2009), což je v souladu s hypotézou, že předchozí stimulace BCR vede ke zvýšení signalizačního potenciálu MHCgpII v důsledku asociace s dimery Ig α/β . Aktivace NFAT pravděpodobně probíhá stejným mechanismem jako po stimulaci BCR. Vápenaté ionty se vážou na kalmodulin, který pak aktivuje fosfatázu kalcineurin a ta defosforyluje, a tím aktivuje NFAT (Kurosaki et al., 2010).

B lymfocyty exprimují tři členy rodiny transkripčních faktorů NFAT: NFATc1, NFATc2 a NFATc3 (Timmerman et al., 1997), které mají důležité regulační funkce v jejich vývoji. NFAT se váže na enhancer sekvenci genu pro membránový glykoprotein CD5, který se podílí na regulaci BCR signalizace (Berland et al., 1998), a také na enhancer genu pro Ig κ , kódující lehký řetězec imunoglobulinu (Meyer et al., 1998). Jako regulátory produkce protilátek byly popsány NFATc1 a NFATc2, jejichž odstranění z B buněk vedlo ke zvýšené tvorbě IgG1 a IgE (Peng et al., 2001). NFAT se také podílí na regulaci časného vývoje B buněk (Gallo et al., 2008). Shrňeme-li tato data, vápníková odpověď, spouštěná stimulací MHCgpII, aktivuje transkripční faktory NFAT, které se pak mohou podílet na regulaci diferenciaci B lymfocytů, zejména na modulaci tvorby protilátek. Tyto funkce, stejně jako další dráhy regulované vápníkovou odpovědí, nebyly však v kontextu signalizace MHCgpII dosud studovány.

4.6. Aktivace PKC

Další důležitou signalizační událostí po stimulaci MHCgpII je aktivace PKC a její translokace z cytosolu do lipidových raftů (Cambier et al., 1987; Chen et al., 1987). V B lymfocytech je PKC β aktivována diacylglycerolem a vápenatými ionty, jejichž intracelulární koncentrace stoupá v důsledku aktivace PLC γ (Kurosaki et al., 2010). Nabízelo by se tedy vysvětlení, že aktivace PKC by mohla být, podobně jako vápníková odpověď, výsledkem signalizace MHCgpII zprostředkované dimery Ig α/β . Bylo však zjištěno, že PKC β je aktivována nezávisle na Src kinázách (Guo et al., 2003) a že transdukce signálu, vedoucího k aktivaci PKC α a PKC β II, vyžaduje intaktní cytoplasmatickou část molekul MHCgpII (Nabavi et al., 1992; Rich et al., 1997), která pravděpodobně není nezbytná pro asociaci s Ig α/β (Jin et al., 2008a). Potřeba cytoplasmatické domény MHCgpII a nezávislost na Src kinázách naznačují, že aktivace PKC β bude zprostředkována jinak než pomocí dimeru Ig α/β . Tuto hypotézu podporuje i fakt, že pro apoptózu B buněk zprostředkovanou MHCgpII, pro kterou je nutná aktivace PKC β (Guo et al., 2003), není potřeba asociace MHCgpII s Ig α/β (Jin et al., 2008a). V rozporu s tímto modelem je ale pozorování, že spuštění apoptózy po stimulaci molekul MHCgpII nezávisí na jejich intracelulárních řetězcích (Jin et al., 2008a). Možným vysvětlením těchto odlišných výsledků by mohlo být, že je apoptóza spouštěna dvěma různými drahami vedoucími z MHCgpII.

Zdá se, že výsledkem MHCgpII-indukované aktivace PKC v B lymfocytech je kromě apoptózy také exprese kostimulační molekuly CD80 (Koulova et al., 1991; Nabavi et al., 1992). Aktivace PKC zřejmě vede i k polymeraci aktinu a reorganizaci cytoskeletu aktivovaných B buněk (Partida-Sánchez et al., 2000). Aktivace PKC je pravděpodobně také

důležitá pro aktivaci MAP (mitogene-activated protein kinase) kinázové dráhy po stimulaci MHCgpII, jak bude popsáno v další kapitole.

4.7. MAP kinázová dráha

Předpokládá se, že spuštění MAP kinázové dráhy po stimulaci MHCgpII probíhá obdobně jako u signalizace vedoucí z BCR. Jak bylo popsáno výše, aktivovaná PLC γ produkuje DAG. Ten potom spolu s PKC β aktivuje výměnný faktor GTPázy Ras, RasGRP3. Aktivovaný Ras se váže na kinázu Raf, která je pak schopna fosforylovat, a tím aktivovat kinázu MEK1/2. Ta fosforyluje kinázu ERK1/2 z rodiny MAP kináz (Kurosaki et al., 2010).

Stimulace MHCgpII opravdu vede k aktivaci kinázy ERK1/2, a tedy ke spuštění MAP kinázové kaskády (Bouillon et al., 2003; Leveille et al., 2002). Haylett et al. ukázali, že fosforylace ERK1/2 je závislá na aktivaci MEK1/2, a identifikovali tak dalšího člena MAP kinázové kaskády spouštěné z MHCgpII. Dále zjistili, že MEK1/2 a ERK1/2 jsou fosforylovány po stimulaci HLA-DP a HLA-DQ, ale ne po stimulaci HLA-DR, a že aktivace MAPK kaskády je tedy závislá na izotypu MHCgpII. Také ukázali, že spuštění MAPK dráhy koreluje se zvýšením hladiny c-Fos, který je komponentou heterodimerní formy transkripčního faktoru AP-1 (Haylett et al., 2009). ERK1/2 stabilizuje c-Fos fosforylací na jeho C-konci (Chen et al., 1996) a reguluje vazbu komplexu AP-1 na DNA a jeho transkripční aktivitu (Chalmers et al., 2007). V souladu s těmito poznatky stimulace HLA-DP a HLA-DQ také vedla ke zvýšené tvorbě komplexu AP-1 (Haylett et al., 2009).

Aktivace MAPK kaskády indukovaná MHCgpII také vede k apoptóze B lymfocytů. Tento signál zřejmě zprostředkovává transmembránový protein MPYS asociovaný s MHCgpII (Jin et al., 2008b), kterému bude věnována zvláštní kapitola.

4.8. Buněčná smrt po stimulaci MHCgpII

Ačkoli stimulace MHCgpII může nepřímo způsobovat apoptózu závislou na kaspázách tím, že zvyšuje citlivost B buněk ke smrti indukované přes Fas receptor (Truman et al., 1997; Yoshino et al., 1995), MHCgpII-indukovaná smrt B buněk probíhá převážně mechanismem nezávislým na kaspázách (Drénou et al., 1999; Nagy et al., 2003). Drénou et al. zjistili, že inhibitory kaspáz neinhibují MHCgpII-zprostředkovanou smrt B lymfocytů. Zároveň ani nepozorovali štěpení jaderného enzymu poly(ADP-ribóza)polymerázy, sloužícího k opravám DNA, který je při apoptóze závislé na kaspázách, kaspázami obvykle štěpen (Lazebnik et al., 1994). Smrt zprostředkovaná MHCgpII je charakteristická rychlou kinetikou a rychlým rozpadem buněk (Nagy et al., 2002; Truman et al., 1994). Dále zde bylo podobně jako

u apoptózy závislé na kaspázách pozorováno vystavení fosfatidylserinu na povrch buňky (Drenou et al., 1999), což vede k rozpoznání a odstranění apoptotického B lymfocytu makrofágy. Také byla zaznamenána fragmentace DNA, i když v menším rozsahu než při apoptóze spouštěné přes Fas receptor (Drénou et al., 1999). Ivanov et al. po stimulaci MHCgpII na lidských leukemických B buňkách pozorovali smrt, při které dochází k reorganizaci aktinového cytoskeletu, vedoucí k homotypické adhezi. Blokování adheze navíc výrazně omezilo schopnost protilátek proti MHCgpII indukovat apoptózu. Polarizovaný cytoskelet také zřejmě sloužil k transportu mitochondrií do místa kontaktu. Dále ukázali, že smrt indukovaná MHCgpII není inhibována klasickým protiapoptotickým proteinem Bcl-2 ani inhibitory kaspáz a nebyla ani pozorována autofágie. Po aktivaci MHCgpII došlo ke zvětšení lyzozómů, vylití jejich obsahu (např. katepsinu B) do cytoplazmy a k následnému rozrušení plazmatické membrány. Podobná buněčná smrt byla pozorována i po stimulaci molekuly CD20, která zprostředkovává signalizaci vedoucí z MHCgpII, jak bylo popsáno výše (Ivanov et al., 2009).

Ne všechny B lymfocyty podléhají apoptóze indukované MHCgpII. Bylo ukázáno, že klidové buňky jsou vůči ní relativně odolné, zatímco aktivované B lymfocyty a lymfocyty nádorového původu jsou k ní velmi citlivé (Nagy et al., 2002; Truman et al., 1994). Vypadá to tedy, že pro MHCgpII-indukovanou buněčnou smrt je důležitá předchozí aktivace nebo nádorová transformace.

4.9. MPYS

Cytoplasmatické části řetězců α a β molekuly MHCgpII, nejsou potřebné pro indukci buněčné smrti B lymfocytů po stimulaci MHCgpII (Jin et al., 2008a), což naznačuje, že pro transdukcii tohoto signálu je nutná asociovaná molekula. Jako molekula zprostředkovávající přenos signálu z MHCgpII, vedoucího k apoptóze B lymfocytů, byl identifikován transmembránový protein MPYS (označovaný také jako STING - stimulator of interferon genes), pojmenovaný podle jeho N-koncové aminokyselinové sekvence methionin-prolin-tyrosin-serin (Jin et al., 2008b). Bylo ukázáno, že exprese proteinu MPYS je nutná pro smrt B lymfocytů, indukovanou protilátkami proti MHCgpII, a pro aktivaci ERK. Zároveň inhibice kináz MEK1/2, které jsou pro aktivaci ERK nezbytné, vedla k potlačení buněčné smrti. Všechny tyto děje se ukázaly být nezávislé na aktivitě Src kináz. Tyto výsledky naznačují, že apoptotická signalizace vedoucí z MHCgpII je zprostředkována asociovaným proteinem MPYS a následnou aktivací ERK, jejíž aktivace není závislá na kinázách z rodiny Src (Jin et al., 2008b).

Jelikož mutace MHCgpII v oblasti na α řetězci, která spojuje transmembránovou a extracelulární doménu a je označována jako α CP (connecting peptide), vedla k výraznému poklesu signálů vedoucích ke smrti buňky po stimulaci MHCgpII (Jin et al., 2008a), je pravděpodobné, že MPYS asociuje s MHCgpII prostřednictvím této domény. MPYS je ve velké míře exprimován ve zralých B lymfocytech, v malé míře pak v pre-B buňkách a nezralých a paměťových B lymfocytech; v plazmatických buňkách nebyla exprese zaznamenána vůbec (Jin et al., 2008b). Změny v expresi proteinu MPYS by mohly souviset s jeho funkcí v transdukcii apoptotických signálů a s rolí B lymfocytů jako APC. Zralé B buňky, exprimující MPYS, by mohly být po odprezentování antigenu eliminovány, což by přispívalo k regulaci imunitní odpovědi na antigen.

Kromě zprostředkování apoptotických signálů má MPYS i inhibiční funkci v signalizaci MHCgpII. MPYS má totiž v cytoplasmatické doméně přítomny motivy ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs), které jsou po prokřížení MHCgpII fosforylovány, a to pravděpodobně kinázami z rodiny Src. Fosforylovaný MPYS pak váže negativní signalizační efekторы SHP-1 (SH2-containing tyrosine phosphatase-1) a SHIP (SH2-domain-containing inositol 5-phosphatase), které výrazně redukují vápníkovou signalizaci, spouštěnou po stimulaci MHCgpII (Jin et al., 2008b). SHP-1 se účastní také signalizace vedoucí z BCR, kde defosforyluje proteiny $Ig\alpha$, $Ig\beta$, Syk, Vav, SLP-65 a CD22 (Dal Porto et al., 2004). Jelikož $Ig\alpha$ a $Ig\beta$ zprostředkovávají vápníkovou signalizaci indukovanou aktivací MHCgpII (Jin et al., 2008a), mohla by jejich defosforylace fosfatázou SHP-1 sloužit jako negativní zpětnovazebná regulace. SHIP štěpí PIP_3 , což je produkt PI3K kinázy, jak bude popsáno v samostatné kapitole (Scharenberg et al., 1998), a mohla by se tak také účastnit negativní zpětnovazebná regulace dráhy PI3K. Dále bylo ukázáno, že MPYS funguje jako negativní regulátor růstu a životnosti B lymfocytů (Jin et al., 2008b), což koreluje s jeho vlivem na vápníkovou a PI3K signalizaci.

Další funkcí proteinu MPYS je úloha v nespecifické imunitní odpovědi na intracelulární mikrobiální patogeny. MPYS se kromě cytoplasmatické membrány nachází i v membráně ER a mitochondrií a účastní se detekce cizorodé DNA a RNA v cytoplasmě, která vede k expresi interferonů (INF) typu I (Ishikawa et al., 2008; Zhong et al., 2008), které jsou centrálními regulátory imunitní odpovědi proti virovým a bakteriálním patogenům. Exprese proteinu MPYS je také nutná pro produkci INF typu I, indukovanou přítomností bakteriálních druhých posílů, cyklických di-GMP a di-AMP, v cytoplasmě (Sauer et al., 2011). Příčiny rozdílů mezi signalizací zprostředkovávanou tímto proteinem po stimulaci MHCgpII a po rozeznání cizorodých látek, pocházejících z různých patogenů, nejsou v současnosti vůbec jasné.

4.10. CD19/PI3K dráha

Další molekulou zprostředkovávající přenos signálu z MHCgpII je CD19 (Bobbitt et al., 2000). CD19 je povrchová molekula, specifická pro B buňky, která se účastní signální transdukce z BCR (Kurosaki et al., 2010). CD19 také asociuje s MHCgpII (Leveille et al., 2002) a je po prokřížení MHCgpII fosforylována na tyrozinových zbytcích, což vede k vazbě efektorových molekul Vav a PI3K, které pak pozitivně regulují vápníkovou odpověď (Bobbitt et al., 2000). Mechanismus vápníkové odpovědi zprostředkované molekulou CD19 zatím nebyl podrobně prostudován. Vyjdeme-li ale opět z analogie se signalizací BCR, lze předpokládat, že produkt kinázy PI3K PIP_3 přivádí po stimulaci MHCgpII k plasmatické membráně PLC γ a kinázu BTK. Ta pak PLC γ aktivuje, což vede k mobilizaci vápníku (Hikida et al., 2005). Aktivace PI3K také pravděpodobně vede k aktivaci kinázy AKT, která byla potvrzena i po stimulaci MHCgpII. AKT zprostředkovává signál zvyšující životaschopnost buněk (Inabe et al., 2002; Mone et al., 2004). Bylo také ukázáno, že pro tuto dráhu není nutná asociace MHCgpII s Ig α/β dimery (Jin et al., 2008a), a Ig α/β se tedy transdukce tohoto signálu pravděpodobně neúčastní.

4.11. Regulace signalizace MHCgpII molekulou CD22

CD22 je B specifický transmembránový lektin, který reguluje signalizaci vedoucí z BCR. Po stimulaci BCR je CD22 fosforylován a přivádí do signalizačního komplexu efektorové proteiny, zejména fosfatázu SHP-1 (Crocker et al., 2007). CD22 je fosforylován a váže fosfatázu SHP-1 i po prokřížení MHCgpII, což vede k poklesu vápníkové signalizace, indukované aktivací MHCgpII (Bobbitt et al., 2000). CD22 je tedy negativním regulátorem signalizace MHCgpII.

5. MHCgpII a membránové mikrodomény

Podobně jako řada dalších membránových proteinů byly i MHCgpII molekuly nalezeny v lipidových raftech (Huby et al., 1999), tedy v malých heterogenních dynamických doménách, bohatých na steroly a sfingolipidy (Pike et al., 2006). Konkrétně rafty, v kterých se na povrchu B lymfocytů nachází MHCgpII, mají vysoký obsah cholesterolu, sfingomyelinu, fosfatidylinositolu a fosfatidylserinu (Knorr et al., 2009). MHCgpII s rafty pravděpodobně asociuje přes acylové řetězce; má totiž v transmembránové doméně cysteiny, které mohou být acylovány (Kaufman et al., 1984). Data o zastoupení MHCgpII v raftech a o tom, zda jsou zde

přítomny konstitutivně, se liší. Podle některých prací jsou MHCgpII v raftech přítomny konstitutivně, nezávisle na stimulaci BCR a MHCgpII (Bouillon et al., 2003; Gupta et al., 2006). Jiné experimenty naopak ukazují zvýšenou asociaci MHCgpII s rafty po aktivaci MHCgpII (Becart et al., 2003; Huby et al., 1999; Setterblad et al., 2001). Příčina těchto odlišných výsledků je pravděpodobně v nejpouvanější metodě, kterou se určuje přítomnost proteinů v raftech. Membrány jsou rozpouštěny pomocí různých detergentů a nerozpustná frakce o nízké hustotě je označena jako raft. Proteiny, které jsou v této frakci detekovány, jsou pak považovány za přítomné v raftech. Proces rozpouštění membrán je však ovlivněn řadou faktorů, jako například druhem a koncentrací detergentu nebo teplotou. Provedení pokusů za různých podmínek může tedy vést k různým výsledkům (Poloso et al., 2004).

Asociace MHCgpII s lipidovými rafty může hrát roli při antigenní prezentaci a aktivaci T lymfocytu při nízké koncentraci antigenu (Anderson et al., 2000). Po setkání T a B buňky a po vytvoření kontaktu mezi nimi jsou do imunologické synapse pomocí aktinového cytoskeletu dopravovány rafty obsahující MHCgpII (Gordy et al., 2004). Dochází zde tak k nahromadění dostatečného množství komplexů peptid-MHCgpII a účinné stimulaci T lymfocytu.

Zdá se, že rafty asociované s MHCgpII se také mohou účastnit spouštění signálů vedoucích z MHCgpII. Podobně je tomu u imunoreceptorů, jako jsou BCR a TCR, které s lipidovými rafty kooperují. Spolu s nimi jsou zde pomocí acylových řetězců kotveny komponenty jejich signalizačních kaskád, jako například kinázy rodiny Src nebo některé adaptorové proteiny (Pierce et al., 2002). Předpokládá se, že analogicky by tomu mohlo být u signalizace MHCgpII. Bylo zjištěno, že integrita lipidových raftů je nezbytná pro spuštění MHCgpII-indukované tyrozinové fosforylace proteinů, a tedy pravděpodobně pro aktivaci Src kináz (Huby et al 1999, Bouillon et al 2003). Integrita lipidových raftů je také důležitá pro aktivaci PKC α po stimulaci MHCgpII a pro signalizaci vedoucí k reorganizaci aktinového cytoskeletu a k mezibuněčné adhezi (Becart et al., 2003; Bouillon et al., 2003). Naopak asociace MHCgpII s rafty není vyžadována pro MHCgpII-zprostředkovanou aktivaci PKC β a následnou buněčnou smrt (Guo et al., 2003) a integrita lipidových raftů není třeba ani pro aktivaci MAP kinázy ERK1/2 (Bouillon et al 2003).

MHCgpII molekuly také asociují s tetraspaninovými mikrodomény. Tetraspaniny jsou rodina proteinů, které čtyřikrát procházejí membránou, jsou často extracelulárně glykosylovány a jejich C- i N-konec směřuje do cytoplazmy (Yáñez-Mó et al., 2009). Bylo popsáno, že MHCgpII asociuje s tetraspaniny CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 a CD82

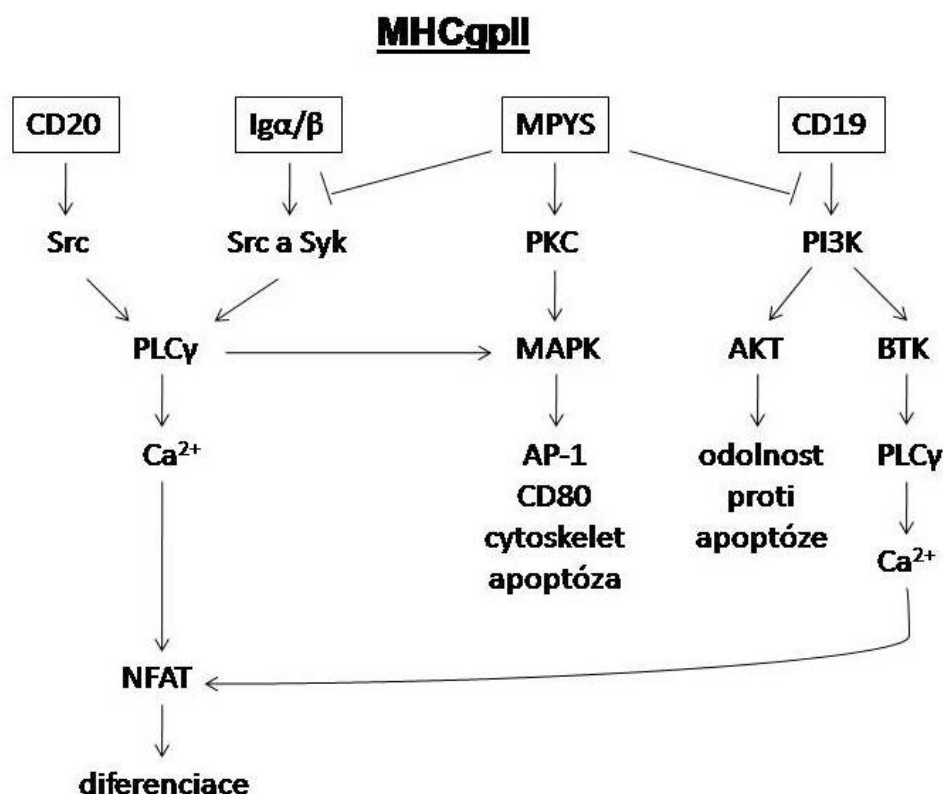
(Angelisova et al., 1994; Rubinstein et al., 1996). Asociace MHCgpII s tetraspaniny je pravděpodobně důležitá pro řádnou aktivaci T buněk (Kropshofer et al., 2002).

Některé experimenty naznačovaly, že jsou tetraspaniny přítomny v lipidových raftech. Proteiny asociované s tetraspaniny byly například nalezeny v lipidových raftech a tetraspaniny jsou navíc acylovány, podobně jako proteiny v raftech (Poloso et al., 2004). Tetraspaninové a lipidové mikrodomény se však liší rozpustností v některých detergentech, tetraspaninové mikrodomény jsou na rozdíl od lipidových odolné vůči odtranění cholesterolu a proteiny typické pro lipidové rafty, jako jsou GPI-kotvené proteiny a kaveolin, s tetraspaniny neasociují. Nyní se tedy spíše zdá, že lipidové rafty a tetraspaninové mikrodomény jsou dvě odlišné struktury (Le Naour et al., 2006). Vzhledem k tomu, že MHCgpII byly nalezeny v obou typech těchto struktur, které navíc byly v minulosti v závislosti na experimentálních podmínkách vzájemně zaměňovány, nelze dnes zcela jednoznačně rozhodnout, se kterými z těchto domén a v jaké míře MHCgpII vlastně interagují.

6. Závěr

Kromě prezentace antigenu je důležitou funkcí MHCgpII spouštění signálů, podílejících se na rozhodnutí o dalším osudu B buňky po setkání s T lymfocylem. Jelikož má však MHCgpII jen velmi krátkou cytoplasmatickou doménu bez signalizačních motivů, je nutná asociace s molekulami, přenášejícími signál z MHCgpII do buňky, mezi které patří CD20, $I\alpha/\beta$, MPYS a CD19 (Obr. 3). Předpokládá se, že signalizace zprostředkovaná dimerem $I\alpha/\beta$ probíhá analogicky jako u signalizace z BCR, kde je jeho role mnohem lépe prozkoumána. $I\alpha/\beta$ tedy zřejmě zprostředkovává signál vedoucí k aktivaci kináz z rodiny Src a Syk, k následné aktivaci $PLC\gamma$ a mobilizaci vápníku. Vápníkovou odpověď by také mohla zprostředkovávat molekula CD20, avšak s tím rozdílem, že jsou po její stimulaci aktivovány pouze kinázy Src. Další molekulou, podílející se na mobilizaci vápníku po stimulaci MHCgpII, je pravděpodobně molekula CD19, která zprostředkovává signál vedoucí k aktivaci kinázy PI3K, následné aktivaci kinázy BTK a fosforylaci $PLC\gamma$. Uvolnění vápenatých iontů po spuštění těchto tří drah by pak mohlo vést k aktivaci transkripčních faktorů NFAT, které se podílejí na regulaci diferenciaci B lymfocytů, zejména pak na modulaci tvorby protilátek. Spuštění dráhy CD19/PI3K po stimulaci MHCgpII zřejmě také vede k aktivaci kinázy AKT, odpovědné za zvýšení odolnosti B buněk vůči apoptóze. Další molekulou, asociovanou s MHCgpII, je transmembránový protein MPYS, který

pravděpodobně zprostředkovává aktivaci PKC a následné spuštění MAP kinázové kaskády. Tato signalizace může vést k aktivaci transkripčního faktoru AP-1, expresi kostimulační molekuly CD80 a reorganizaci cytoskeletu, ale také k apoptóze. MPYS se na negativní regulaci vývoje B buněk může podílet i tak, že inhibuje signalizaci zprostředkovanou dimerem Igα/β a dráhu CD19/PI3K. Toto je pouze navržený model signalizace MHCgpII, poskládaný ze současných poznatků, a pro jeho případné potvrzení a doplnění bude třeba další studium.



Obr. 3 Model signalizace MHCgpII v B lymfocytech

MHCgpII zprostředkovává jak signály zahrnující proliferaci a diferenciaci B buněk, tak signály vedoucí k buněčné smrti, a může se tedy podílet na zahájení i ukončení imunitní odpovědi. Navzdory této významné funkci signalizace MHCgpII není dosud jasný mechanismus, kterým je v buňce rozhodnuto, zda bude spuštěna signalizace aktivační nebo inhibiční. Dalším důvodem pro podrobnější studium signalizace MHCgpII je její terapeutické využití. Cílené spouštění apoptózy v leukemických buňkách by totiž mohlo výrazně přispět k léčbě tohoto druhu rakoviny.

Použitá literatura

- Al-Daccak R, Mooney N, Charron D (2004). MHC class II signaling in antigen-presenting cells. *Current Opinion in Immunology* 16: 108-113.
přehledný článek
- Anderson HA, Hiltbold EM, Roche PA (2000). Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nature Immunology* 1: 156-162.
- Andreae S, Buisson S, Triebel F (2003). MHC class II signal transduction in human dendritic cells induced by a natural ligand, the LAG-3 protein (CD223). *Blood* 102: 2130-2137.
- Andreae S, Piras F, Burdin N, Triebel F (2002). Maturation and Activation of Dendritic Cells Induced by Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223). *The Journal of Immunology* 168: 3874-3880.
- Angelisova P, Hilgert I, Horejsi V (1994). Association of 4 antigens of the tetraspans family (CD37, CD53, TAPA-1, AND R2/C33) with MHC class-II glycoproteins. *Immunogenetics* 39: 249-256.
- Apostolopoulos V, Yuriev E, Lazoura E, Yu M, Ramsland PA (2008). MHC and MHC-like molecules: structural perspectives on the design of molecular vaccines. *Hum Vaccin* 4: 400-9.
přehledný článek
- Barreiro O, De La Fuente H, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F (2007). Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunological Reviews* 218: 147-164.
přehledný článek
- Becart S, Setterblad N, Ostrand-Rosenberg S, Ono SJ, Charron D, Mooney N (2003). Intracytoplasmic domains of MHC class II molecules are essential for lipid-raft-dependent signaling. *Journal of Cell Science* 116: 2565-2575.
- Berland R, Wortis HH (1998). An NFAT-Dependent Enhancer Is Necessary for Anti-IgM-Mediated Induction of Murine CD5 Expression in Primary Splenic B Cells. *The Journal of Immunology* 161: 277-285.
- Bobbitt KR, Justement LB (2000). Regulation of MHC class II signal transduction by the B cell coreceptors CD19 and CD22. *Journal of Immunology* 165: 5588-5596.
- Boisvert J, Edmondson S, Krummel MF (2004). Immunological Synapse Formation Licenses CD40-CD40L Accumulations at T-APC Contact Sites. *The Journal of Immunology* 173: 3647-3652.
- Bouillon M, El Fakhry Y, Girouard J, Khalil H, Thibodeau J, Mourad W (2003). Lipid raft-dependent and -independent signaling through HLEA-DR molecules. *Journal of Biological Chemistry* 278: 7099-7107.
- Brown K, Levitt D, Shannon M, Link B (2001). Phase II Trial of Remitogen™ (Humanized 1D10) Monoclonal Antibody Targeting Class II in Patients with Relapsed Low-Grade or Follicular Lymphoma. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 2: 188-190.
- Buisson S, Triebel F (2003). MHC class II engagement by its ligand LAG-3 (CD223) leads to a distinct pattern of chemokine and chemokine receptor expression by human dendritic cells. *Vaccine* 21: 862-868.

- Cambier JC, Lehmann KR (1989). IA-mediated signal transduction leads to proliferation of primed lymphocytes-B. *Journal of Experimental Medicine* 170: 877-886.
- Cambier JC, Newell MK, Justement LB, McGuire JC, Leach KL, Chen ZZ (1987). IA binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in lymphocytes-B. *Nature* 327: 629-632.
- Campbell KS, Bäckström BT, Tiefenthaler G, Palmer E (1994). CART: a conserved antigen receptor transmembrane motif. *Seminars in Immunology* 6: 393-410.
- Carlo-Stella C, Di Nicola M, Turco MC, Cleris L, Lavazza C, Longoni P *et al* (2006). The anti-human leukocyte antigen-DR monoclonal antibody 1D09C3 activates the mitochondrial cell death pathway and exerts a potent antitumor activity in lymphoma-bearing nonobese diabetic/severe combined Immunodeficient mice. *Cancer Research* 66: 1799-1808.
- Crocker PR, Paulson JC, Varki A (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 7: 255-266.
přehledný článek
- Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT, Mills D, Pugh-Bernard AE, Cambier J (2004). B cell antigen receptor signaling 101. *Molecular Immunology* 41: 599-613.
přehledný článek
- Deans JP, Li H, Polyak MJ (2002). CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology* 107: 176-182.
- Drake JR, Webster P, Cambier JC, Mellman I (1997). Delivery of B cell receptor-internalized antigen to endosomes and class II vesicles. *Journal of Experimental Medicine* 186: 1299-1306.
- Drenou B, Blancheteau V, Burgess DH, Fauchet R, Charron DJ, Mooney NA (1999). A caspase-independent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *Journal of Immunology* 163: 4115-4124.
- Dyer MJS, Hale G, Hayhoe FGJ, Waldmann H (1989). Effects of campath-1 antibodies invivo in patients with lymphoid malignancies - influence of antibody isotype. *Blood* 73: 1431-1439.
- Elgueta R, Benson MJ, De Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunological Reviews* 229: 152-172.
přehledný článek
- Fooksman DR, Vardhana S, Vasiliver-Shamis G, Liese J, Blair DA, Waite J *et al* (2010). Functional Anatomy of T Cell Activation and Synapse Formation. *Annual Review of Immunology* 28: 79-105.
přehledný článek
- Friedl P, den Boer AT, Gunzer M (2005). Tuning immune responses: Diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology* 5: 532-545.
přehledný článek
- Fuleihan R, Mourad W, Geha RS, Chatila T (1991). Engagement of MHC-class-II molecules by staphylococcal exotoxins delivers a comitogenic signal to human B-cells. *Journal of Immunology* 146: 1661-1666.
- Gallo EM, Ho L, Winslow MM, Staton TL, Crabtree GR (2008). Selective role of calcineurin in haematopoiesis and lymphopoiesis. *Embo Reports* 9: 1141-1148.

Gordy C, Mishra S, Rodgers W (2004). Visualization of antigen presentation by actin-mediated targeting of glycolipid-enriched membrane domains to the immune synapse of B cell APCs. *Journal of Immunology* 172: 2030-2038.

Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM *et al* (1999). The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285: 221-227.

Guo WY, Castaigne JG, Mooney N, Charron D, Al-Daccak R (2003). Signaling through HLA-DR induces PKC beta-dependent B cell death outside rafts. *European Journal of Immunology* 33: 928-938.

Gupta N, Wollscheid B, Watts JD, Scheer B, Aebersold R, DeFranco AL (2006). Quantitative proteomic analysis of B cell lipid rafts reveals that ezrin regulates antigen receptor-mediated lipid raft dynamics. *Nature Immunology* 7: 625-633.

Haylett RS, Koch N, Rink L (2009). MHC class II molecules activate NFAT and the ERK group of MAPK through distinct signaling pathways in B cells. *European Journal of Immunology* 39: 1947-1955.

Hikida M, Kurosaki T (2005). Regulation of Phospholipase C gamma2 Networks in B Lymphocytes. In: Frederick W. Alt KFATKFMJWU and Emil RU (eds). *Advances in Immunology*. Academic Press. pp 73-96.

přehledný článek

Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ (2004). Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Human Immunology* 65: 282-290.

přehledný článek

Huby RDJ, Dearman RJ, Kimber I (1999). Intracellular phosphotyrosine induction by major histocompatibility complex class II requires co-aggregation with membrane rafts. *Journal of Biological Chemistry* 274: 22591-22596.

Chalmers CJ, Gilley R, March HN, Balmano K, Cook SJ (2007). The duration of ERK 1/2 activity determines the activation of c-Fos and Fra-1 and the composition and quantitative transcriptional output of AP-1. *Cellular Signalling* 19: 695-704.

Chen RH, Juo PCH, Curran T, Blenis J (1996). Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene* 12: 1493-1502.

Chen ZZ, McGuire JC, Leach KL, Cambier JC (1987). Transmembrane signaling through B-cell MHC class-II molecules - anti-IA antibodies induce protein-kinase-C translocation to the nuclear fraction. *Journal of Immunology* 138: 2345-2352.

Inabe K, Kurosaki T (2002). Tyrosine phosphorylation of B-cell adaptor for phosphoinositide 3-kinase is required for Akt activation in response to CD19 engagement. *Blood* 99: 584-589.

Ishikawa H, Barber GN (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 456: 274-274.

Ivanov A, Beers SA, Walshe CA, Honeychurch J, Alduaij W, Cox KL *et al* (2009). Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *Journal of Clinical Investigation* 119: 2143-2159.

- Jin L, Stolpa JC, Young RM, Pugh-Bernard AE, Refaeli Y, Cambier JC (2008a). MHC class II structural requirements for the association with Ig alpha/beta, and signaling of calcium mobilization and cell death. *Immunology Letters* 116: 184-194.
- Jin L, Waterman PM, Jonscher KR, Short CM, Reisdorph NA, Cambier JC (2008b). MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals. *Molecular and Cellular Biology* 28: 5014-5026.
- Kanner SB, Grosmaire LS, Blake J, Schieven GL, Masewicz S, Odum N *et al* (1995). ZAP-70 and P72(SYK) are signaling response elements through MHC class-II molecules. *Tissue Antigens* 46: 145-154.
- Kansas G, Tedder T (1991). Transmembrane signals generated through MHC class II, CD19, CD20, CD39, and CD40 antigens induce LFA-1-dependent and independent adhesion in human B cells through a tyrosine kinase-dependent pathway. *The Journal of Immunology* 147: 4094-4102.
- Kaufman JF, Krangel MS, Strominger JL (1984). Cysteines in the transmembrane region of major histocompatibility complex antigens are fatty acylated via thioester bonds. *Journal of Biological Chemistry* 259: 7230-7238.
- Knorr R, Karacsonyi C, Lindner R (2009). Endocytosis of MHC molecules by distinct membrane rafts. *Journal of Cell Science* 122: 1584-1594.
- Koretzky GA, Abtahian F, Silverman MA (2006). SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nat Rev Immunol* 6: 67-78.
přehledný článek
- Koulova L, Clark EA, Shu G, Dupont B (1991). The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 173: 759-762.
- Kropshofer H, Spindeldreher S, Rohn TA, Platania N, Grygar C, Daniel N *et al* (2002). Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes. *Nature Immunology* 3: 61-68.
- Kurosaki T, Shinohara H, Baba Y (2010). B Cell Signaling and Fate Decision. *Annual Review of Immunology* 28: 21-55.
přehledný článek
- Lane P, McConnell F, Schieven G, Clark E, Ledbetter J (1990). The role of class II molecules in human B cell activation. Association with phosphatidyl inositol turnover, protein tyrosine phosphorylation, and proliferation. *The Journal of Immunology* 144: 3684-3692.
- Lang P, Stolpa JC, Freiberg BA, Crawford F, Kappler J, Kupfer A *et al* (2001). TCR-induced transmembrane signaling by peptide/MHC class II via associated Ig-alpha/beta dimers. *Science* 291: 1537-1540.
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ice. *Nature* 371: 346-347.
- Le Naour F, Andre M, Boucheix C, Rubinstein E (2006). Membrane microdomains and proteomics: Lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics* 6: 6447-6454.
přehledný článek
- Leveille C, Al-Daccak R, Mourad W (1999). CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines. *European Journal of Immunology* 29: 65-74.

- Leveille C, Castaigne JG, Charron D, Al-Daccak R (2002). MHC class II isotype-specific signaling complex on human B cells. *European Journal of Immunology* 32: 2282-2291.
- Meyer KB, Ireland J (1998). PMA/ionomycin induces Ig kappa 3' enhancer activity which is in part mediated by a unique NFAT transcription complex. *European Journal of Immunology* 28: 1467-1480.
- Mone AP, Huang P, Pelicano H, Cheney CM, Green JM, Tso JY *et al* (2004). Hu1D10 induces apoptosis concurrent with activation of the AKT survival pathway in human chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 103: 1846-1854.
- Monks CRF, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395: 82-86.
- Mooney N, Grillot-Courvalin C, Hivroz C, Ju L, Charron D (1990). Early biochemical events after MHC class II-mediated signaling on human B lymphocytes. *The Journal of Immunology* 145: 2070-2076.
- Morio T, Geha RS, Chatila TA (1994). Engagement of MHC class II molecules by staphylococcal superantigens activates src-type protein tyrosine kinases. *European Journal of Immunology* 24: 651-658.
- Mourad W, Geha RS, Chatila T (1990). Engagement of major histocompatibility complex class-II molecules induces sustained, lymphocyte function-associated molecule-1-dependent cell-adhesion. *Journal of Experimental Medicine* 172: 1513-1516.
- Mourad W, Scholl P, Diaz A, Geha R, Chatila T (1989). The staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1 triggers B-cell proliferation and differentiation via major histocompatibility complex-unrestricted cognate T/B-cell interaction. *Journal of Experimental Medicine* 170: 2011-2022.
- Nabavi N, Freeman GJ, Gault A, Godfrey D, Nadler LM, Glimcher LH (1992). Signalling through the MHC class II cytoplasmic domain is required for antigen presentation and induces B7 expression. *Nature* 360: 266-268.
- Nagy ZA, Hubner B, Lohning C, Rauchenberger R, Reiffert S, Thomassen-Wolf E *et al* (2002). Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nature Medicine* 8: 801-807.
- Nagy ZA, Mooney NA (2003). A novel, alternative pathway of apoptosis triggered through class II major histocompatibility complex molecules. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 81: 757-765.
přehledný článek
- Nashar TO, Drake JR (2006). Dynamics of MHC class II-activating signals in murine resting B cells. *Journal of Immunology* 176: 827-838.
- Partida-Sánchez S, Garibay-Escobar A, Frixione E, Parkhouse RME, Santos-Argumedo L (2000). CD45R, CD44 and MHC class II are signaling molecules for the cytoskeleton-dependent induction of dendrites and motility in activated B cells. *European Journal of Immunology* 30: 2723-2728.
- Peng SL, Gerth AJ, Ranger AM, Glimcher LH (2001). NFATc1 and NFATc2 Together Control Both T and B Cell Activation and Differentiation. *Immunity* 14: 13-20.
- Pierce SK (2002). Lipid rafts and B-cell activation. *Nat Rev Immunol* 2: 96-105.
přehledný článek

Pike LJ (2006). Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research* 47: 1597-1598.

Poloso NJ, Roche PA (2004). Association of MHC class II-peptide complexes with plasma membrane lipid microdomains. *Current Opinion in Immunology* 16: 103-107.
přehledný článek

Rich T, Lawler SE, Lord JM, Blancheteau VM, Charron DJ, Mooney NA (1997). HLA class II-induced translocation of PKC alpha and PKC beta II isoforms is abrogated following truncation of DR beta cytoplasmic domains. *Journal of Immunology* 159: 3792-3798.

Rodriguez-Fernandez JL, Riol-Blanco L, Delgado-Martin C (2010). What Is the Function of the Dendritic Cell Side of the Immunological Synapse? *Sci. Signal.* 3: re2-.
přehledný článek

Rodriguez-Pinto D (2005). B cells as antigen presenting cells. *Cellular Immunology* 238: 67-75.
přehledný článek

Rubinstein E, LeNaour F, LagaudriereGesbert C, Billard M, Conjeaud H, Boucheix C (1996). CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *European Journal of Immunology* 26: 2657-2665.

Sauer JD, Sotelo-Troha K, von Moltke J, Monroe KM, Rae CS, Brubaker SW *et al* (2011). The N-Ethyl-N-Nitrosourea-Induced Goldenticket Mouse Mutant Reveals an Essential Function of Sting in the In Vivo Interferon Response to *Listeria monocytogenes* and Cyclic Dinucleotides. *Infection and Immunity* 79: 688-694.

Setterblad N, Becart S, Charron D, Mooney N (2001). Signalling via MHC class II molecules modifies the composition of GEMs in APC. *Scandinavian Journal of Immunology* 54: 87-92.

Scharenberg AM, El-Hillal O, Fruman DA, Beitz LO, Li ZM, Lin SQ *et al* (1998). Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P-3) Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *Embo Journal* 17: 1961-1972.

Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS (2009). T Cell Activation. *Annual Review of Immunology* 27: 591-619.
přehledný článek

Tabata H, Matsuoka T, Endo F, Nishimura Y, Matsushita S (2000). Ligation of HLA-DR molecules on B cells induces enhanced expression of IgM heavy chain genes in association with Syk activation. *Journal of Biological Chemistry* 275: 34998-35005.

Timmerman LA, Healy JI, Ho SN, Chen L, Goodnow CC, Crabtree GR (1997). Redundant expression but selective utilization of nuclear factor of activated T cells family members. *Journal of Immunology* 159: 2735-2740.

Triebel F (2003). LAG-3: a regulator of T-cell and DC responses and its use in therapeutic vaccination. *Trends in Immunology* 24: 619-622.

Trombetta ES, Mellman I (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review of Immunology* 23: 975-1028.
přehledný článek

Truman J-P, Ericson ML, Choqueux-Séebold CJM, Charron DJ, Mooney NA (1994). Lymphocyte programmed cell death is mediated via HLA class II DR. *International Immunology* 6: 887-896.

Truman JP, Choqueux C, Tschopp J, Vedrenne J, LeDeist F, Charron D *et al* (1997). HLA class II-mediated death is induced via Fas/Fas ligand interactions in human splenic B lymphocytes. *Blood* 89: 1996-2007.

Vose JM, Link BK, Grossbard ML, Czuczman M, Grillo-Lopez A, Gilman P *et al* (2001). Phase II study of rituximab in combination with CHOP chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 19: 389-397.

Yáñez-Mó M, Barreiro O, Gordon-Alonso M, Sala-Valdés M, Sánchez-Madrid F (2009). Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends in Cell Biology* 19: 434-446.

přehledný článek

Yoshino T, Cao L, Nishiuchi R, Matsuo Y, Yamadori I, Kondo E *et al* (1995). Ligation of HLA class II molecules promotes sensitivity to CD95 (Fas antigen, APO-1)-mediated apoptosis. *European Journal of Immunology* 25: 2190-2194.

Zhong B, Yang Y, Li S, Wang Y-Y, Li Y, Diao F *et al* (2008). The Adaptor Protein MITA Links Virus-Sensing Receptors to IRF3 Transcription Factor Activation. *Immunity* 29: 538-550.